



Novos marcadores da nefropatia diabética

A necessidade de marcadores precoces

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina

Paulo Miguel Rodrigues Coelho

Aluno 6º ano profissionalizante

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto

Número institucional: 200704122

Contacto: +351913925890

Email: pacreal1988@gmail.com

Orientadora: Dra. Maria Manuela Barbosa de Almeida

Docente – Assistente convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; Assistente hospitalar de Nefrologia

Afiliação: Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto

Mestrado Integrado em Medicina

Ano letivo de 2015/2016

Agradecimentos

À Dra. Manuela Almeida, por ter sido incansável no tempo e atenção que me disponibilizou para este trabalho.

Aos meus pais e irmã, pelo apoio que sempre me deram. Obrigado pela paciência que tiveram com alguns dos meus erros.

À Filipa, a minha parceira de vida, e à minha filha Maria que todos os dias me dão as forças para progredir.

Resumo

Contexto: A nefropatia diabética (ND) representa uma complicação microvascular com importantes repercussões na mortalidade e morbilidade dos doentes com Diabetes mellitus, seja tipo 1 ou tipo 2. Esta doença é uma das causas mais importantes de doença renal crónica terminal (DRCT), com a sua incidência a aumentar perante a epidemia global da diabetes mellitus tipo 2. A progressão para DRCT ocorre em até 40% daqueles que desenvolvem ND, tendo o tratamento desta fase elevados custos associados com transplantação e diálise. Uma estratégia de redução da carga da doença poderá passar por reconhecer estádios precoces, permitindo implementar intervenções que atrasem a progressão, diminuindo custos e melhorando os resultados clínicos.

Objetivos: Neste trabalho é feita uma revisão de vários estudos científicos disponíveis sobre o valor preditivo e as relações de diversos biomarcadores com a ND. São também referidos vários aspetos desta doença para contextualizar a necessidade de biomarcadores mais precoces.

Desenvolvimento: Desde a identificação da albuminúria como fator de risco para a progressão desta doença tem-se procurado outros biomarcadores mais precoces que a microalbuminúria. Esta procura é motivada pelo reconhecimento gradual das limitações deste marcador, pela necessidade de melhorar o impacto epidemiológico associado à ND mas também pelos crescentes custos associados a esta.

Conclusões: Existem inúmeras moléculas que foram sendo estudadas como potenciais biomarcadores para esta doença mas muitas não apresentaram valor preditivo significativo. No entanto um conjunto considerável de marcadores têm ganho destaque por estarem associados com disfunção precoce. A genómica de miRNA e a proteómica têm dado contributos preciosos para a investigação desta doença e de marcadores, mas cada vez mais se vislumbra um enorme potencial nestas técnicas pela criação de perfis com elevado valor preditivo.

Palavras-Chave: Nefropatia diabética; biomarcadores da nefropatia diabética; Doença renal crónica; microalbuminúria; proteómica; miRNA; tratamento da nefropatia diabética; Diabetes mellitus.

Abstract

Background: The diabetic nephropathy (DN) represents microvascular complication with important repercussions on mortality and morbidity in patients with Diabetes mellitus, either type 1 or type 2. This disease is one of most important causes of end-stage renal disease (ESRD), with a rising incidence on the account of the global epidemic of type 2 Diabetes mellitus. The progression to ESRD occurs in up to 40% of those that will develop DN, with the treatment of this phase associated with high costs due to transplantation and dialysis. One strategy to reduce the burden of this disease might be to recognize early stages, allowing to implement interventions that delay the progression, cutting costs and enhancing clinical outcomes.

Objectives: This work is a review of various available scientific studies about the predictive value and the relationships of numerous biomarkers with DN. It will also be referred various aspects of this disease to frame the need for earlier biomarkers.

Development: Since the identification of albuminuria as a risk factor for the progression of this disease there has been a search for earlier biomarkers than microalbuminuria. This search is driven by the increasing recognition of the limitations of this biomarker, the need of enhancing the epidemiologic impact associated with DN but also because of the rising costs associated with this disease.

Conclusions: There are numerous molecules that have been studied as potential biomarkers for this disease but many haven't showed significant predictive value. On the other hand, a considerable group of markers has been highlighted for being associated with early dysfunction. The miRNA genomics and proteomics have given precious contributes towards the investigation of this disease and markers but there is an increasing interest on the enormous potential of the profiles created by these techniques due to their high predictive value.

Keywords: Diabetic nephropathy; biomarkers of diabetic nephropathy; chronic kidney disease; microalbuminuria; proteomics; miRNA; treatment of diabetic nephropathy; Diabetes mellitus

Lista de Abreviaturas:

AGEs – Produtos finais de glicação avançada

AUC - Área debaixo da curva (*Area Under the Curve*)

DM -*Diabetes Mellitus*

DRC -Doença Renal Crónica

DRCT - Doença Renal Crónica Terminal

EROs - Espécies Reativas de Oxigénio

HTA - Hipertensão Arterial

KIM - Molécula de dano renal 1

miRNA - microRNAs

NGAL - Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófilica

ND - Nefropatia Diabética

PAI - Inibidor do Ativador de Plasminogénio

PKC - Proteína Cinase C

ROC - Operação do Recetor (*Receiver Operating Characteristic*)

RUAC - Rácio Urinário Albumina/Creatinina

TA - Tensão Arterial

TFG - Taxa de Filtração Glomerular

TGFb - Fator de Crescimento Transformante beta

TFGe - Taxa de Filtração Glomerular Estimada

TNFa - Fator de Necrose Tumoral alfa

uIgG - Imunoglobulina G Urinária

uNGAL - Lipocalina Associada à Gelatinase Neutrófilica Urinária

uTransf - Transferrina Urinária

Conteúdo

Resumo.....	3
Abstract	4
Lista de Abreviaturas.....	5
Introdução.....	7
Biomarcadores	8
Breve descrição da nefropatia diabética.....	9
Definição de nefropatia diabética	9
Patofisiologia da nefropatia diabética	9
Tratamento da ND.....	11
Marcadores de Nefropatia Diabética.....	13
Marcadores de dano glomerular.....	14
Albumina	14
Transferrina	15
Marcadores de origem inflamatória	15
Fator de necrose tumoral alfa.....	15
Marcadores de dano tubular	16
Lipocalina associada à gelatinase neutrófila (NGAL)	16
Molécula de dano renal 1 (KIM).....	17
Proteína ligante de ácidos gordos tipo hepático – L-FABP	18
Proteína ligante do retinol - RBP	19
Alfa 1 microglobulina (A1M)	20
N-acetil-beta-d-glucosaminidase – NAG	21
Proteômica	22
miRNA.....	22
Conclusão	23
Referências.....	24

Introdução

Apesar da evolução considerável na terapêutica da diabetes mellitus (DM) e de uma das suas mais importantes complicações, a nefropatia diabética (ND) permanece a principal causa de doença renal crónica (DRC) em muitos países ocidentais.

Os dois principais tipos de DM são o tipo 1 e tipo 2, sendo o tipo 2 responsável por mais de 85% da prevalência total desta doença. Em termos globais, este aumento é maior em países em via de desenvolvimento e é o reflexo do aumento da prevalência da obesidade, que apesar de ser mais marcado nestes países também ocorre nos países desenvolvidos.[1]

A *International Federation for Diabetes* estimou que em 2011 existiam 366 milhões de diabéticos no mundo, ou seja, 8.3% da população adulta, e que este número, em 2030, aumente para 522 milhões, sendo este acréscimo verificado na sua maioria nos países em vias de desenvolvimento. É de salientar que este crescimento anual na prevalência (2,7%) é cerca de 1,7 vezes superior à taxa esperada de crescimento da população mundial, denotando que, em termos epidemiológicos, estamos perante uma progressão acelerada da doença[2].

Deste modo, a Nefropatia Diabética representa um significativo desafio económico facilmente perceptível, por exemplo, pelos custos globais anuais por doente para a progressão da albuminúria nos doentes com ND nos Estados Unidos: de normoalbuminúria para microalbuminúria - 2764 dólares, de microalbuminúria para macroalbuminúria - 3618 dólares e da progressão depois da macroalbuminúria - 56745 dólares.[3] Tendo ainda como referência os EUA, no ano de 1999 concluiu-se que se fosse possível reduzir em 10% a taxa de declínio da TFG em doentes com TFG igual ou inferior a 60 mL/min/1,73m² a poupança, em 2010, seria de 18556 milhões de dólares e o custo global num subsistema federal de saúde norte-americano para a DRCT seria de 28000 milhões.[4]

Na Austrália estima-se que um ano de tratamento de substituição renal para um doente diabético com DRCT custe cerca de 73 000 dólares. Sendo previsível, para este país, que o custo global atual de 450 milhões de dólares duplique na próxima década.[5] Dadas as semelhanças da Austrália e dos Estados Unidos com muitos países europeus, em termos de paridade económica e de estilo de vida, será provável que estes terão custos idênticos.

Com base nestes números é lícito presumir que prevalência da DM irá aumentar nas próximas décadas e, consequentemente, também a prevalência da ND. Este aumento terá repercussões sociais e económicas significativas, em particular nos países em vias de desenvolvimento, nos quais haverá os maiores aumentos de incidência e prevalência e que também dispõem de orçamentos para a saúde mais limitados.

Assim sendo, serão necessárias estratégias específicas e orientadas para objetivos concretos de modo a contrapor estes efeitos, nomeadamente a existência de marcadores fiáveis para o diagnóstico precoce, a monitorização da doença e dos tratamentos e a definição de grupos de risco para determinados eventos como a doença renal crónica terminal (DRCT).

O diagnóstico precoce assume especial importância dado a DM e a ND serem doenças sem cura e cujo tratamento tem várias limitações como será explanado neste trabalho.

As guidelines da *American Diabetes Association* refletem a necessidade de um diagnóstico precoce de ND em diabéticos e recomendam um rastreio anual baseado no rácio urinário albumina/creatinina (RUAC) e na taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) em diabéticos tipo 1 com mais de 5 anos de doença e em todos os diabéticos tipo 2.[6] A National Kidney Foundation através das suas guidelines concorda com estas recomendações, sendo que atribui em diabéticos uma doença renal crónica (DRC) de forma presumida à DM se estiver presente macroalbuminúria ou microalbuminúria juntamente ou com retinopatia ou com uma DM tipo 1 (DM1) com mais de 10 anos de duração.[7, 8]

Nos últimos 20 anos, graças aos múltiplos desenvolvimentos na biologia molecular e na genómica, ocorreu a identificação de inúmeras moléculas implicadas em funções diversas que refletem os vários eventos patofisiológicos desta doença complexa. Deste conjunto alguns marcadores têm recebido destaque pelo potencial que apresentam para o diagnóstico precoce.

Assim, o presente trabalho pretende apresentar o estado presente da arte no que respeita ao valor preditivo e à aplicabilidade de novos marcadores para a clínica médica.

Biomarcadores

O *National Institute of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiu biomarcador, ou marcador biológico, como uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a intervenção terapêutica.[9]

Como partem, frequentemente, da investigação patofisiológica são biologicamente plausíveis e relacionam-se com outros marcadores já estabelecidos. Um aspeto prático que deve ser tido em conta é a disponibilidade dos produtos biológicos e a facilidade no seu processamento.[10]

Dos vários requisitos os mais importantes serão a especificidade e sensibilidade e a sua análise conjunta com curvas características de operação do recetor (*receiver operating characteristic* ou ROC). Esta análise relaciona a sensibilidade com a taxa de falsos positivos, numa classificação binária para um dado marcador, usando um valor de *cut-off* específico. A função resultante permite obter um parâmetro, a área debaixo da curva (*area under the curve* ou AUC) no qual 1.0 representa um marcador ideal e 0.5 um marcador cujo resultado é equivalente ao obtido a um resultado aleatório. Esta análise é muito relevante pois um marcador pode ser altamente sensível e, no entanto, ter uma considerável taxa de falsos positivos, sendo que a conjugação otimizada destes dois parâmetros permite obter marcadores mais úteis e adequados.[10]

Breve descrição da nefropatia diabética

Este capítulo pretende ser um enquadramento dos aspetos mais relevantes desta doença em termos epidemiológicos e patofisiológicos bem como demonstrar os benefícios e limitações tanto do tratamento como da albuminúria.

Definição de nefropatia diabética

Segundo a *National Kidney Foundation*, a ND refere-se a DRC que presumivelmente é causada por DM. A ND pode ser detetada clinicamente por uma excreção urinária de albumina anormalmente aumentada de modo persistente (sendo tal definido como 2 ou mais amostra elevadas num período de 3 a 6 mês) e por uma taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) diminuída. A biópsia raramente é usada, mas permite estabelecer o diagnóstico definitivo. A albuminúria tem sido tradicionalmente dividida em microalbuminúria (um rácio urinário de albumina/creatinina (RUAC) de 30 a 300mg/g ou 20 a 200ug/min ou 30 a 300 mg/dia) ou macroalbuminúria (um RUAC >300 mg/g ou >200ug/min ou >300mg/dia). As estimativas da TFG derivadas da creatinina plasmáticas (usando a formula *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) pode ser usada para estadia a ND, mas a TFGe isolada apenas pode detetar de modo preciso o estágio 3 ou superior da ND (TFGe <60ml/min/1,73m²).[8]

Patofisiologia da nefropatia diabética

A nefropatia diabética é uma das complicações microvasculares mais importantes da DM e a sua patogénese é complexa e não completamente compreendida. Existem vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da ND, tais como a interação entre mudanças metabólicas induzidas pela hiperglicemia e alterações hemodinâmicas. A glicose e os seus metabolitos ativam a proteína cinase C (PKC), a via dos polióis, a via da hexosamina e a glicação não-enzimática, e estas vias, por sua vez, contribuem para alterações funcionais e estruturais no rim.[11] A via dos polióis dá um contributo considerável na produção da fator de crescimento tumoral beta (TGFb), e na estimulação da PKC. A via da hexosamina ativa fatores de transcrição que induzem fatores pró-escleróticos como o TGFb e o inibidor do ativador de plasminogénio (PAI). A PKC tem um papel central nesta doença ao ser ativada por várias vias, algumas já referidas, mas também pelo aumento da produção de novo de diacilglicerol resultante do aumento intracelular de glicose. Esta via medeia o aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) no mesângio glomerular.[11] A glicação não-enzimática representa outra via importante dado ser responsável pela formação dos precursores dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Este conjunto heterogéneo de moléculas têm em comum a capacidade de ativar recetores específicos, os RAGEs. A ativação destes recetores medeia efeitos pleiotrópicos, que vão desde o aumento do stress oxidativo intracelular, à hipertrofia glomerular ou à disfunção endotelial. Assim, a hiperglicemia desempenha um papel central na cadeia de danos causados pelas citocinas e fatores de crescimento que produzem stress oxidativo, glicosilação anormal, peroxidação lipídica, e à produção de outros elementos inflamatórios. Sobrepostos a estes mecanismos estão alterações transientes e a longo prazo na tensão arterial e na hemodinâmica.[11]

As alterações hemodinâmicas com hiperperusão glomerular e hiperfiltração tornam-se evidentes antes dos primeiros sinais, clinicamente mensuráveis, de nefropatia. A hiperfiltração glomerular é mais precoce manifestação renal da DM e resulta da hipertensão capilar glomerular e é acompanhada por um aumento do fluxo sanguíneo glomerular. Existem três teorias possíveis para este cenário hemodinâmico: alteração primária na função tubular, alteração primária na função vascular e aumento primário na área total de filtração. Sobre estas alterações hemodinâmicas renais primárias justapõe-se a ativação de um sistema regional de renina-angiotensina, causada pela hiperglicemia, pelos EROs (espécies reativas de oxigênio) e AGEs. Estas moléculas ativam e são ativadas por este sistema criando um círculo vicioso que sustentam as alterações hemodinâmicas glomerulares. No entanto o SRA renal ativado também ativa várias citocinas como o TGFb, o fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), interleucina-6, proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) que contribuem para alterações tubulares e glomerulares.[11] A partir deste exemplo parece existir uma plêiade de mediadores implicados de forma muito complexa, que estendem a doença para além dos efeitos primários diretos da hiperglicemia e das alterações hemodinâmicas. Destes mediadores, um deve ser realçado dado o papel central em muitas das alterações da ND, o TGFb. Esta é uma via presente em todos os estádios, desde a hipertrofia precoce à esclerose tardia, estando notoriamente implicado em alterações pró-escleróticas com aumento da deposição de proteínas da MEC e na inibição da degradação destas.[11]

Em suma existe um conjunto muito alargado de alterações funcionais cuja expressão está ligada a alterações estruturais características da ND. Alguns exemplos destas relações são o declínio da TFG, para o qual contribuem várias alterações patológicas como expansão mesangial, esclerose difusa e a expansão intersticial. Já para a albuminúria são alterações no mesângio, no número e estrutura dos podócitos e na membrana glomerular basal as que mais contribuem para esta alteração funcional.

Estas alterações estruturais são muito características da ND e entre as mais frequentes incluem-se: os espessamentos das membranas basal glomerular e basal tubular, a expansão mesangial, a hialinose das arteríolas e capilares glomerulares e a expansão fibrótica do interstício. Apesar de existirem mais estudos patológicos na DM1, um estudo constatou que apesar da maior variabilidade de alterações patológicas na DM2, para doentes proteinúricos as alterações estruturais são semelhantes e é a gravidade destas que prediz o declínio posterior da TFG na ND.[12]

São estas alterações estruturais e funcionais que vão permitindo definir a história natural do envolvimento renal da DM. Este envolvimento foi mais estudado na DM1 e permitiu criar um arquétipo do curso da ND, que é paralelo aquele observado na DM2.

Tabela 1 - Estádios clínicos da ND

Estádio	TFG	Albuminúria	Anos após diagnóstico	Alterações histológicas
1.Hiperfiltração	Acima do normal	Normoalbuminúria (<30mg/dia)	0	Nefromegalia/ hipertrofia
2.Microalbuminúria	Normal a elevada	Microalbuminúria (30 a 300 mg/dia)	5-15	Glomeruloesclerose/ expansão mesangial
3. Proteinúria marcada	Normal ou diminuída	Macroalbuminúria (>300mg/dia)	10-20	Glomeruloesclerose nodular

4. Nefropatia progressiva	Em declínio	Em progressão	15-25	Progressão das lesões
5. DRCT	<15mL/min	Maciça	20-30	Esclerose grave e global

Já na DM2, pela natureza mais gradual das alterações da homeostasia da glicose e das manifestações clínicas, a duração é difícil de determinar, sabendo, no entanto, que ao diagnóstico pelo menos 10% destes diabéticos têm nefropatia. Os estudos em índios Pima, uma tribo norte-americana na qual a instalação da DM2 é muito mais precoce e conhecida de modo mais preciso que em outras etnias, demonstraram que ambos os tipos de DM têm cursos de envolvimento renal muito semelhantes entre si.[12]

Estes paralelismos entre os cursos de envolvimento renal nos dois tipos de DM também foram sendo traçados com vários estudos epidemiológicos, inicialmente realizados na DM1. Em estudos conduzidos 2 a 3 décadas atrás era estimado que cerca de 80% dos microalbuminúricos com DM1 iria progredir para proteinúria nos próximos 10 anos e ficava vinculada uma ideia de que a microalbuminúria era o primeiro passo para um inexorável declínio na função renal. Em estudos mais recentes verificou-se que apenas 20 a 45% dos diabéticos tipo 1 com microalbuminúria irá progredir para macroalbuminúria após 10 anos de seguimento. A ideia de inevitável declínio ficava posta em causa quando se constatou que 20 a 25% retornou a níveis microalbuminúricos nos 6 a 10 anos subsequentes. Outro estudo constatou o valor preditivo da microalbuminúria ao comparar os normoalbuminúricos com doentes com microalbuminúria persistente, tendo sido observado um aumento de risco 3 a 4 vezes superior ao risco de progressão para proteinúria e DRCT, neste último grupo. [12]

Para a DM2 a taxa de progressão de microalbuminúria para macroalbuminúria foi semelhante à dos diabéticos tipo 1, com cerca de 30% dos doentes em ambos os tipos de DM e após 10 anos de seguimento, a alcançar este estágio da ND. Assim, um estudo reportou que 31% dos diabéticos tipo 2 doentes que eram inicialmente microalbuminúricos progrediu para proteinúria, enquanto que a mesma proporção de doentes regrediu para normoalbuminúria e 38% permaneceu microalbuminúrico após 8 anos de seguimento. Neste estudo também foi evidenciado, num seguimento posterior, que aqueles que eram normoalbuminúricos tiveram menos taxas de declínio da TFG quando comparados com doentes que permaneceram microalbuminúricos ou que progrediram para proteinúria.[12]

No entanto o valor prognóstico renal da microalbuminúria na DM2 não é tão claro como na DM1. Isto deve-se provavelmente a vários fatores, incluindo a instalação da diabetes e à frequente coexistência de hipertensão, obesidade, hiperinsulinemia e hiperlipidemia. Estes fatores de risco cardiovasculares, isoladamente ou dentro da síndrome metabólica, obtiveram, em vários estudos, associações independentes com a microalbuminúria. Assim a microalbuminúria nestes doentes pode representar também um marcador de disfunção endotelial generalizada, tornando mais difícil a interpretação da albuminúria enquanto marcador de envolvimento renal na diabetes tipo 2.[13]

Tratamento da ND

Tanto na DM1 como na DM2, a ND representa uma complicação com mortalidade considerável. Na DM2, uma análise prospetiva em doentes com proteinúria basal 19,5% desenvolveu DRCT [14]. A incidência para DRCT foi 2,5 vezes maior que a mortalidade cardiovascular e 1,5 vezes a mortalidade total. Na DM1 um estudo prospetivo com 200 participantes seguiu dois grupos, um normoalbuminúricos e outro microalbuminúrico, tendo falecido em cada grupo, respetivamente

8% e 30%. No grupo microalbuminúrico 42% faleceram por doença cardiovascular e 50% por DRCT. [15]

Estes estudos são ilustrativos de que a mortalidade na ND é significativa, que a DRCT é a maior causa de morte, mas que a mortalidade cardiovascular é significativa. Para evitar a mortalidade e morbilidade cardiovasculares e renais associadas com a albuminúria e a disfunção renal devem ser empregadas estratégias concretas e comprovadas de intervenção.

Das intervenções possíveis na ND o controlo da HTA (hipertensão arterial) é talvez uma das mais importantes na prevenção da sua progressão. A HTA um fator de risco nas complicações microvasculares da DM bem como na doença renal e como tal na ND o seu controlo é fundamental, estando frequentemente presente ao diagnóstico da DM2 mas na DM1 geralmente só se manifesta após a microalbuminúria. [16]

A importância do controlo da TA (tensão arterial) nas complicações da DM é demonstrado pelo estudo UKPDS, no qual, cada diminuição de 10 mmHg na TAS (TA sistólica) esteve associada com uma redução de 12% no risco destas complicações. [17] O estudo *Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial* (IDNT) também demonstrou a importância do controlo da TA, dado que o decréscimo progressivo da TAS até um patamar de 120 mmHg estava associado com uma diminuição do risco de progressão para DRCT. [18, 19] Uma investigação, o RENAAL, demonstrou uma associação semelhante, com o aumento da TAS basal a relacionar-se com aumento do risco para DRCT ou morte.[20]

Dos vários agentes usados no controlo tensional destes doentes, os IECAs e ARAs destacaram-se, pois, obtiveram benefícios superiores quando comparados com outros hipertensores.

No IDNT a comparação entre irbesartan e amlodipina para um resultado renal combinado, que consistia da duplicação da creatinina sérica ou DRCT, evidenciou que o ARA obtinha melhores resultados e que tais benefícios eram independentes das diferenças no grau de controlo tensional observado. [18, 19] Noutro estudo, o DETAIL, uma comparação entre o enalapril e o telmisartan, para doentes com ND precoce, constatou resultados semelhantes para o declínio na TFG, o controlo tensional e o risco de DRCT. [21]

Destes estudos torna-se aparente que IECAs e ARAs têm eficácia semelhante e que os seus efeitos renoprotetivos não são explicados apenas pelo controlo tensional que exercem.

No estudo Captopril-Diabetes foi constatado que o grupo com redução superior a 50% na excreção proteica após terapia anti-hipertensiva obtinha um melhor resultado renal a longo prazo quando comparado com o grupo de sem remissão. Neste estudo o grupo com remissão também evidenciou uma TFG estável face ao grupo sem remissão que teve um declínio da TFG. [22]

Uma análise posterior do IDNT aferiu que após terapia com irbesartan, a redução da proteinúria foi maior face à amlodipina, para o mesmo grau de diminuição da TA e que este maior efeito na proteinúria pelo irbesartan repercutiu-se numa maior redução de risco para insuficiência renal face à amlodipina. [23]

No estudo RENAAL o emprego do losartan obteve resultados semelhantes para a albuminúria. Numa análise posterior a este estudo foi constatado, que após ajustar o efeito da diminuição da TA com este fármaco, a diminuição da albuminúria foi responsável por metade da diminuição da incidência de DRCT. [24]

Deste modo existe evidência de que IECAs e ARAs possuem um efeito antiproteínúrico marcado que contribuiu juntamente com o efeito antihipertensor para a diminuição dos riscos de DRCT e de progressão da ND. A identificação precoce da ND ou pelo menos de um subgrupo de doentes com maior risco de declínio de função renal, poderia permitir a utilização mais atempada do tratamento atualmente disponível de modo a evitar a progressão para estádios mais avançados numa porção mais significativa de doentes.

Marcadores de Nefropatia Diabética

Enquanto doença renal crónica, a ND tem origem em insultos não completamente entendidos em termos de natureza e de tempo. Dado ser uma doença complexa com inúmeros mecanismos patogénicos envolvidos torna-se estuante destrinçar o valor efetivo das várias relações entre si e com parâmetros clínicos e patológicos. Na procura de molécula com valor preditivo significativo para a ND foram estudadas ao longo das 3 últimas décadas vários marcadores.

Tabela 2 - Biomarcador renal ideal

Características ideais de um marcador renal	
Aumento rápido e fiável na doença	Reconhece causa de dano
Sensível e específico	Não invasivo
Correlação com dano renal	Útil na monitorização de intervenções
Estratificação de risco	Amostras estáveis e facilmente processáveis
Informação prognóstica	Identificação de lesão e mecanismo específicos
Sem interferências de fatores espúrios	Método analítico fiável, disponível e barato
Aplicabilidade universal	

Tabela 3 - Marcadores da ND em estudo

Potenciais marcadores da Nefropatia diabética	
Dano glomerular	Dano tubular
Albumina	Alfa 1 microglobulina
Transferrina	RBP
Ceruloplasmina	NGAL
IgG	KIM-1
Nefrina	NAG
Laminina	L-FABP
Glicosaminoglicanos	<i>Inflamação</i>
Fibronectina	TNFα
Podocalixina	IL-18
Colagéneo IV	MCP-1

Vários destes marcadores figuram na tabela anterior e não serão descritos por não terem apresentado, até à data presente, evidência significativa para associações com parâmetros clínicos da ND ou valor preditivo. O colagéneo tipo IV, a podocalixina, a fibronectina, a laminina e os glicosaminoglicanos foram incapazes de prever a microalbuminúria. A ceruloplasmina

urinária previu a microalbuminúria em normoalbuminúricos com DM2 no entanto não se conhece estudo semelhante para a DM1 ou correlação com a albuminúria e TFG. [25] Também neste estudo a imunoglobulina G urinária demonstrou ser capaz de prever a microalbuminúria em normoalbuminúricos com DM2. No entanto não se conhecem associações significativas entre a TFG ou a albuminúria e estes dois últimos marcadores.

Os restantes marcadores serão descritos neste trabalho dado terem apresentado valor preditivo significativo na ND. Será dada maior relevância aos marcadores precoces, nomeadamente aqueles que permitam prever a microalbuminúria, dado este estágio ser, presentemente, o estágio clínico mais precocemente mensurável. As associações, independentes, com a TFG e albuminúria merecem também destaque, dado estes serem os principais parâmetros clínicos desta doença

Marcadores de dano glomerular

A ND afeta todos os elementos celulares do rim, no entanto muitas das alterações patológicas mais características desta doença afetam principalmente o glomérulo. Estas alterações podem ser sucintamente descritas pela acumulação de matriz extracelular com espessamento da membrana basal do glomérulo, aumento da matriz mesangial e ultimamente glomerulosclerose. [26-28] O dano glomerular pode ser representado por marcadores ligados ao aumento da permeabilidade de proteínas plasmáticas ou pelo aumento de excreção de proteínas da matriz extracelular. Quando os marcadores estão relacionados com o aumento da permeabilidade da barreira glomerular isto pode ocorrer por aumento da pressão intraglomerular ou perdas de seletividades para o peso e para a carga elétrica, embora existam dados conflituosos sobre a seletividade elétrica. [29-33]

Albumina

A albumina é uma proteína hepática de 65 kDa com funções de transporte, de tamponamento ácido-base e regulador da pressão oncótica [34]. Esta proteína é a mais abundante do plasma e normalmente apenas uma pequena porção é filtrada no glomérulo, sendo esta fração reabsorvida na quase totalidade nos túbulos renais. [35, 36] A elevação da excreção urinária de albumina é considerada um marcador estabelecido de dano glomerular. No entanto a disfunção tubular por si só pode causar albuminúria por diminuição da reabsorção tubular da albumina filtrada.[34]

O valor preditivo deste marcador para vários eventos renais na ND e na DRC está bem estabelecido, sendo o *gold standard* nesta doença. Isto é ilustrado pela albuminúria basal como forte fator de risco para DRC e preditor mais forte para a DRCT na DM2 [37]. A morbilidade e mortalidade cardiovascular que são elevadas na DM, em particular na DM 2, têm como forte preditor a albuminúria. [38, 39] Algumas limitações deste marcador devem ser tidas em conta. Vários estudos afirmaram que a morbilidade renal está elevada em indivíduos dentro no intervalo normal. [40, 41] Para além disto, 30% dos diabéticos com disfunção renal são normoalbuminúricos.[42]

A albuminúria é o marcador clássico da nefropatia diabética, sendo um dos parâmetros clínicos que faz parte da definição dos estádios desta doença. É o principal marcador de dano glomerular, embora possa ter uma contribuição da disfunção tubular. O teste atualmente empregue para albuminúria é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), no entanto recentemente surgiu um novo método mais sensível e precoce que ainda não está estabelecido na clínica, a cromatografia líquida de elevada eficiência.

Transferrina

A transferrina é uma proteína plasmática com um peso molecular semelhante à albumina com 76,5 kDa e com função de transporte de ferro. Apresenta um menor caráter aniônico que a albumina, fazendo supor que seria mais facilmente filtrada. [43]

Um aumento significativo da excreção urinária da transferrina (uTransf) em diabéticos tipo 2 foi associado com lesões glomerular difusas, com fibrose e inflamação intersticiais. [44, 45] Estas lesões glomerulares são relativamente precoces no dano glomerular e estão presentes em diabéticos tipo 2 normoalbuminúricos, tendo 33% deste grupo apresentado níveis de uTransf acima do normal. [44]

Comparando controlos saudáveis com diabéticos, a uTransf exibiu maiores níveis neste ultimo grupo. [46, 47] Em vários estudos ficou patente que os diabéticos exibem mais precocemente transferrinúria que albuminúria e que o rácio urinário albumina/transferrina é maior na macroalbuminúria que na normo e microalbuminúria. O aumento deste rácio reflete a precocidade relativa do aumento da transferrinúria face à albuminúria. [48-50]

A uTransf também demonstrou valor preditivo para a microalbuminúria em normoalbuminúricos com DM2 através de uma análise regressão logística multivariada num estudo longitudinal com 140 participantes.[51]

A uTransf não está correlacionada com o controlo glicémico sugerindo que este marcador está ligado intrinsecamente com o dano renal.[52] Contudo um bom contro glicémico em diabéticos tipo 2 recém-diagnosticados este associado a uma diminuição da uTransf numa amostra de 40 diabéticos.[53]

Há evidência de que uTransf seja um marcador mais precoce para o dano renal que a microalbuminúria, tendo mesmo valor preditivo para esta. Este fato tem particular importância dado a transferrina ser um marcador já usado rotineiramente em outros contextos e o seu emprego clinico poder ser útil para prever quais doentes tem maior risco de progressão na ND e na albuminúria. O teste atualmente empregue neste marcador é o ELISA, um método comprovado, fiável, barato e facilmente disponível e manuseável.

Marcadores de origem inflamatória

Fator de necrose tumoral alfa

O fator de necrose tumoral alfa (TNFa) é uma potente citocina proinflamatória e um importante mediador do dano tecidual causado pela inflamação. No rim esta citocina é expressa e libertada por macrófagos infiltrados e pelos vários tipos celulares renais.[54, 55] Tem havido cada vez mais evidência de que a TNFa está implicada de forma importante na patogénese na ND ao contribuir para a inflamação, apoptose e deposição de matriz extracelular. Esta citocina também foi implicada em alterações funcionais como a redução do fluxo sanguíneo no glomérulo e no dano da barreira glomerular. [56-58]

Diversos estudos demonstraram o aumento das concentrações urinárias e séricas desta citocina em diabéticos face a controlos saudáveis e a diabéticos sem evidência de envolvimento renal. Estes estudos também reportaram um aumento significativo na excreção urinária de TNFa (uTNFa) em diabéticos tipo 2 com albuminúria elevada face a normoalbuminúricos. [59-61] Um outro estudo transversal foi concordante com esta premissa e acrescentou que o uTNFa estava associada de modo significativo e independente com a albuminúria.[62]

No entanto, os níveis séricos dos recetores para o TNFa, TNFR1 e TNFR2, também demonstraram relações importantes na ND. Num estudo em diabéticos tipo 1 não proteinúricos, com 667 participantes, as concentrações séricas destes dois recetores foram correlacionadas negativamente com a TFG num modelo de análise multivariada que ponderava albuminúria e idade.[63]

Noutro estudo longitudinal com 410 diabéticos tipo 2, os níveis séricos de ambos recetores foram relacionados com o risco de DRCT, no entanto na análise de uma regressão de Cox ajustada para albuminúria apenas o TNFR1 manteve a predição.[64] Este valor preditivo do TNFR1 para a DRCT também foi manifestada num estudo longitudinal com 140 diabéticos tipo 1 com nefropatia avançada.[65]

A TNFa está implicada de modo substancial num dos aspetos importantes da ND, um estado crónico de baixa inflamação que é responsável por muitas alterações estruturais e funcionais. A uTNFa relacionou-se com a albuminúria de modo independente, mas, no entanto, são os níveis séricos dos recetores para esta citocina que exibem considerável valor preditivo. O TNFR1 e TNFR2 exibiram relações com TFG independentes da albuminúria o que pode permite identificar doentes com maior risco de declínio da TFG. O TNFR1 também exibiu valor preditivo para DRCT tanto na DM1 e DM2. Deste modo, estes marcadores poderão identificar doentes com maiores riscos de declínio na TFG., o que é de particular importâncias nos doentes que permanecem persistentemente normoalbuminúricos e com diminuição gradual da TFG. Tanto o TNFa urinário como os seus recetores solúveis podem ser facilmente detetados com recurso a um teste ELISA, sendo o seu processamento relativamente simples e rápido.

Marcadores de dano tubular

Tem sido demonstrado que a extensão do dano glomerular e nível de TFG nem sempre estão bem correlacionados e que o dano tubulointersticial está associado com redução da função renal.[66]

As alterações patológicas no túbulo apesar de não específicas são aparentes antes da proteinúria marcada e relacionam-se melhor com função renal e prognóstico do que o dano glomerular. É também cada vez mais evidente que o túbulo suscetível a vários fatores hemodinâmicos e metabólicos associados com a diabetes.[67]

A hiperglicemia, os AGEs e os EROs são os principais patogénicos que causam toxicidade tubular com disfunção e alterações patológicas. Este dano resulta localmente em isquemia, inflamação, fibrose intersticial e glomeruloesclerose.[68]

No entanto também deve ser destacado que o aumento da quantidade de proteína no lúmen tubular, secundário a dano glomerular, tem efeitos tóxicos sobre o túbulo que contribuem de modo direto para o dano e disfunção desta estrutura e assim contribuem para a progressão da ND.[69]

Em seguida, serão descritos vários marcadores urinários de disfunção tubular, os quais na sua maioria estão associados de forma precoce com a ND.

Lipocalina associada à gelatinase neutrófila (NGAL)

A NGAL faz parte da superfamília das lipocalinas e tem ação bacteriostática ao inibir sideróforos bacterianos.

Esta molécula é expressa nos neutrófilos, mas também no epitélio renal entre outros tecidos,

estando a sua expressão aumentada em estados inflamatórios. As formas em circulação podem contribuir para os níveis urinários, dado esta molécula ter baixo peso molecular, 25kDa, e ser filtrada no glomérulo.[70] No entanto um estudo relacionou o dano tubulointersticial, na doença renal crónica, diretamente com a forma monomérica. Atualmente não existe um meio rotineiro para diferenciar estas várias formas desta proteína.[71]

A relação da excreção urinária de NGAL (uNGAL) com a ND começa desde a DM com níveis elevados, tanto na DM1 como DM2, face a controlos saudáveis não-diabéticos [72, 73]. A associação é estreita e reflete-se no aumento deste marcador com o mau controlo glicémico e a maior duração da DM.[74, 75]

A uNGAL relaciona-se com a albuminúria, em ambos os tipos de DM, com um aumento progressivo desde a normoalbuminúria até à macroalbuminúria e com diferenças significativas entre os diferentes estádios deste parâmetro. [76, 77] Esta mesma relação demonstrou ser independente da TFG, idade, sexo e dos níveis séricos da NGAL. [78]

Nos microalbuminúricos este marcador demonstrou ter um valor preditivo importante. Constatou-se um aumento nos normoalbuminúricos face a controlos [79, 80] e também um aumento significativo quando este primeiro grupo progride para a microalbuminúria. [77, 81] Este valor foi demonstrado num estudo transversal com 50 participantes através de uma análise de regressão multivariada, em diabéticos tipo 1, com a uNGAL a prever a microalbuminúria. [79] Também para a DM2, foi aferida, com uma análise de curva ROC para a microalbuminúria, uma AUC de 0.956 na diabetes e 0.974 na pré-diabetes. [82] Noutro estudo semelhante na DM2, a uNGAL demonstrou valores de AUC de 0,759 e 0.848 para prever, respetivamente, microalbuminúria e macroalbuminúria. [83]

Para além disto a uNGAL apresentou valor preditivo para a progressão da DRC mesmo após ajuste para parâmetros clínicos, como a TFG e a idade [84] A TFG, na DM2 e na DM1, também demonstrou uma associação com a uNGAL, que era dependente da albuminúria.[85, 86] Poderá ser esta dependência que torna este marcador incapaz de prever, tanto na DM1 como DM2, e de modo significativo, um maior declínio na TFG quando ponderados promotores de progressão, como a albuminúria ou a HbA1c. [84, 86, 87] No entanto a elevação deste marcador demonstrou, num estudo longitudinal, uma associação positiva com a DRCT e a mortalidade global. Neste mesmo estudo registou-se um ligeiro aumento no valor preditivo para DRCT quando se adicionava este marcador com a albuminúria e a TFG. [88]

A uNGAL exibiu associações com a albuminúria e a TFG ainda que não se tenha evidenciado que estas sejam independentes uma da outra. No entanto, demonstrou valor preditivo para as progressões na DRCT e na microalbuminúria e por isso é um marcador com interesse potencial na avaliação da história natural da ND. Este marcador pode ser analisado recorrendo a testes ELISA comerciais, com um custo entre 10 a 20 dólares, bem como em sistemas *point-of-care*.

Molécula de dano renal 1 (KIM)

A KIM é uma glicoproteína transmembranar tipo 1 que pertence á família da imunoglobulina mucina-1 das células T (TIM-1). Esta molécula é normalmente indetetável em rins saudáveis, mas a sua expressão aumenta nas membranas apicais das células do TP após dano. A forma solúvel é um ectodomínio que é libertado através de uma via sensível ao stress celular. A libertação desta molécula, em modelos animais, resulta em desdiferenciação do epitélio, um passo fundamental na regeneração tubular. Existe evidência que relaciona uma interação entre

o KIM-1 é um ligando natural, TIM-4, na perpetuação da inflamação.[89] Estes achados são suportados por uma relação entre esta molécula e alterações fibróticas exibida em modelos experimentais de DRC.[90]

A relação deste marcador com a ND é precoce. A excreção urinária de KIM (uKIM) demonstra níveis elevados em diabéticos face a controlos e associações positivas com a duração da DM e pior controlo glicémico. [91] Esta relação é reforçada pela constatação, em dois estudos na DM2, que a diminuição da sensibilidade à insulina associou-se com o aumento dos níveis deste marcador.

Outra correlação positiva importante foi a do aumento da uKIM com a albuminúria, de modo independente de várias características clínicas. Neste estudo também foram evidenciadas diferenças significativas entre estádios de albuminúria. [92]

Foi demonstrada uma correlação negativa deste marcador com a TFG [91], sendo a elevação da uKIM um fator de risco independente para uma TFG baixa. [93] Outro estudo aprofundou esta relação ao constatar uma associação entre níveis elevados deste marcador com um declínio mais rápido na TFG. [94] Noutro estudo esta associação foi reforçada e acrescentou-se que existe um aumento no risco de morte com a elevação deste marcador. [95]

Vários estudos têm indicado que no estágio de normoalbuminúria, tanto na DM1 como DM2, já exista uma elevação considerável da uKIM. [75, 96, 97] Num destes estudos também foi possível aferir que o aumento na uKIM já estava presente antes do declínio da TFG.[75] Assim, para além de provavelmente ser um marcador precoce, o uKIM demonstrou uma forte associação entre baixos níveis basais e a regressão da microalbuminúria, de modo independente de características clínicas.[98]

A uKIM também demonstrou utilidade como alvo terapêutico dado ter ocorrido uma diminuição dos níveis deste marcador e de albuminúria em resposta ao tratamento com o irbesartan na ND. Os autores deste estudo sugeriram que a diminuição da albuminúria causaria uma diminuição da toxicidade tubular relacionada com a albumina filtrada. [99]

Este marcador exibiu uma relação estreita com a diminuição da homeostasia da glicose, um importante promotor da ND e muito provavelmente do dano no TP. A associação da elevação uKIM com um maior declínio da TFG também deve ser destacado dado a alta prevalência da ND normoalbuminúria em diabéticos tipo 2. À semelhança da uNGAL, a uKIM demonstrou valor preditivo na microalbuminúria, em particular na sua regressão e poderá ser um alvo terapêutico na aplicação de IECAs ou ARAs. O uKIM pode ser facilmente determinado com kits comerciais de ELISA.

Proteína ligante de ácidos gordos tipo hepático – L-FABP

A proteína ligante de ácidos gordos tipo hepático (ou FABP1) faz parte da família de proteínas transportadoras de ácidos gordos, transportando preferencialmente ácidos gordos de cadeias longa e muito longa. Esta molécula é expressa no fígado, mas também no rim, no túbulo proximal.[100] Vários estudos em modelos animais de doença renal têm demonstrado que a expressão do gene da L-FABP humana no rim e a excreção urinária estão aumentadas perante diversos agentes de stress como isquemia e estiramento tubulares, hiperglicemia, toxinas e hipertensão, todos estes causadores de dano tubulointersticial. [101]

Alguma evidência tem sugerido que na proteinúria marcada, os ácidos gordos livres ligados á albumina sobrecarregam o TP, induzem fatores inflamatórios e a expressão da L-FABP. Esta proteína poderá ter um efeito renoprotetivo ao inibir o stress oxidativo pela inibição da oxidação de AG livres e por ter uma capacidade antioxidante.

Os níveis medidos na urina têm origem principalmente nas células tubulares, apesar de existirem fontes não renais para esta proteína. [102]

A excreção urinária de L-FABP (uFABP) correlacionou-se com a albuminúria nos diabéticos e doentes com ND.[103, 104] Esta correlação foi também evidenciada pelo aumento gradual da uFABP desde a normoalbuminúria até à macroalbuminúria, tendo-se registado diferenças significativas entre os diferentes estádios de albuminúria. [104, 105]

Para dois estudos foi demonstrada uma correlação negativa com o outro parâmetro clínico fundamental da ND, a TFG. [106, 107]

A uFABP evidenciou uma correlação positiva com o rácio urinário de proteína/creatinina o que pode reforçar a premissa de que a toxicidade tubular das proteínas aumente a secreção da uFABP. [108]

Ao comparar quantitativamente a uFABP entre diabéticos normoalbuminúricos e controlos saudáveis foi demonstrado um aumento no primeiro grupo. [103] Este marcador apresentou valores mais elevados nos doentes microalbuminúricos e macroalbuminúricos face a doentes com normoalbuminúria persistente. A esta precocidade do aumento da uFABP acrescenta-se um valor preditivo para o desenvolvimento da microalbuminúria, que foi independente de vários parâmetros clínicos [109].

Também num estudo longitudinal, em diabéticos tipo 2 sem nefropatia avançada, foi evidenciado que maiores níveis de uFABP estavam associados com a deterioração da função renal, mesmo no grupo dos normoalbuminúricos. [107]

A uFABP também exhibe capacidade preditiva para as progressões da ND e de DRCT bem como para a mortalidade nestes doentes. Exemplo disto é um grupo de doentes sem disfunção renal cujos maiores níveis deste marcador foram associados com progressão de ND. [104] O progresso para DRCT também exibiu uma relação positiva com a uFABP e que foi independente da TFG e albuminúria basais. [88] Esta associação esta que também evidenciada num estudo longitudinal com 552 participantes. Neste mesmo estudo foi realizada uma análise ROC comparando a albuminúria e a uFABP para progressão da ND, tendo ambos obtido, respetivamente, 0.857 e 0.849. [104] A mortalidade nos doentes com ND também exibiu uma associação positiva e independente com a elevação dos níveis de uFABP. [110]

A uFABP demonstrou relacionar-se com o dano tubular pelo aumento de proteína no lúmen tubular e demonstrou ter valor preditivo para progressão na ND em doentes sem disfunção renal grave e normoalbuminúricos.

Proteína ligante do retinol - RBP

A RBP pertence à superfamília das lipocalinas. Esta proteína tem como função o transporte do retinol para os tecidos periféricos e expressa principalmente no fígado e no tecido adiposo. No plasma forma um complexo com a transtirretina que a impede de ser filtrada através do glomérulo. Na sua forma livre de retinol e transtirretina, tem um peso molecular de 21kDa,

sendo filtrada e reabsorvida e catabolizada nas células do TP. Mais recentemente tem sido descrita como uma adipocitocina que contribuiu para a resistência à insulina.[111]

Os níveis séricos e urinários deste marcador demonstraram, em vários estudos, estar elevados em diabéticos face a controlos saudáveis e ter-se correlacionado, de modo positivo e significativo, com a albuminúria. [112] Esta correlação com a excreção urinária de albumina também ficou evidente pelo aumento gradual deste marcador com a progressão nos estádios de albuminúria. [113] A relação com a DM é também suportada pela correlação positiva com a duração desta endocrinopatia e um pior controlo glicémico.[112]

Um estudo evidenciou que tanto a uRBP como a sRBP tinham níveis superiores num grupo de doentes com pré-diabetes e DM2 face a controlos com normal tolerância à glicose. Nesta investigação os níveis séricos e urinários deste marcador relacionaram-se com a glicemia em jejum, com o nível de triglicéridos séricos e RUAC, e de modo inverso com a TFG. [114]

Vários estudos têm indicado que a uRBP já se encontra aumentada em diabéticos normoalbuminúricos quando comparados com controlos saudáveis. [115] Um destes estudos demonstrou que 82% destes doentes existiam níveis de RBP acima do normal. neste mesmo estudo, no grupo de doentes normoalbuminúricos foi também exibida uma correlação deste marcador com a HbA1c. [112]

A transição de normoalbuminúria para microalbuminúria teve associada um aumento na uRBP [112]. Num destes estudos, este aumento ficou associado com valor preditivo para microalbuminúria, mesmo após ajuste para outros parâmetros metabólicos. Este valor preditivo foi analisado através de uma curva ROC que obteve uma AUC de 0.8 com sensibilidade e especificidade respetivamente, de 80% e 64%. [114]

A uRBP também demonstrou benefício preditivo no seguimento da ND ao ter sido associado com o risco composto pela necessidade de diálise e morte em diabéticos macroalbuminúricos.[116]

Os níveis urinários desta proteína demonstraram uma relação com o controlo glicémico o que a pode tornar num alvo de monitorização para o dano renal no tratamento da DM. A uRBP também exibiu valor preditivo para a microalbuminúria, podendo assim identificar doentes com maior risco de progressão para albuminúria e ND. Este marcador pode ser analisado com recurso a um teste ELISA, facilmente disponível e de simples processamento.

Alfa 1 microglobulina (A1M)

A A1M é uma glicoproteína de 27 kD a que pertence à superfamília das lipocalinas e é expressa em quase todos os tecidos, mas principalmente no rim e no fígado. No plasma humano, 50% desta proteína forma um complexo com imunoglobulina A monomérica. Após a secreção, a A1M existe sobre a forma livre que passa pelo glomérulo para os túbulos no qual é reabsorvida e posteriormente catabolizada. Uma forma complexada, com a IgA, tem a sua passagem através do glomérulo determinada pela TFG. Acredita-se que esta proteína funcione como um *scavenger* de radicais, ou seja liga-se a agentes oxidantes e radicais livres protegendo as células dos danos destas moléculas nocivas.[117]

Em diabéticos foi demonstrado um aumento na uA1M face a controlos saudáveis correlações positivas com os níveis de AGEs, duração da DM, HbA1c e glicemias em jejum e pós-prandial, reafirmando a relação desta molécula com a hiperglicemia e os mecanismos patofisiológicos da ND. [118, 119] Para este primeiro grupo foram evidenciadas correlações, de modo positivo, com a albuminúria e, de modo negativo, com a TFG. [120, 121] A relação com a hiperglicemia é particularmente importante dado este parâmetro ser um fator de risco para níveis elevados de A1M. [122]

Vários estudos têm indicado um possível valor preditivo deste marcador para a microalbuminúria.

A uA1M demonstrou níveis elevados em diabéticos normoalbuminúricos quando comparados com os níveis em controlos saudáveis. [123, 124] Um estudo registou um aumento significativo nos níveis de uA1M nos microalbuminúricos face a normoalbuminúricos. [125] Este marcador identificou, numa amostra com controlos saudáveis, diabéticos normoalbuminúricos com uma especificidade e sensibilidade, respetivamente, de 94% e 96%. [126]

A uA1M por ser um marcador tubular, por identificar normoalbuminúricos e por se relacionar com albuminúria e a TFG, pode identificar a disfunção tubular num estágio anterior à microalbuminúria. Para este marcador também pode ser usado um teste ELISA.

N-acetil-beta-d-glucosaminidase – NAG

A NAG é uma enzima lisossomal de elevado peso molecular, com 140 kDa que é expressa em vários tecidos e tem como função a hidrólise de glicosídeos. Esta molécula está presente em elevadas concentrações em lisossomas das células do túbulo proximal. Dado não ser filtrada através do glomérulo o aumento na urina deve-se ao dano tubular com perda de integridade dos lisossomas. Esta perda de integridade será secundária à disfunção tubular causada pelo aumento do trânsito proteico do lúmen para o epitélio tubular.[127]

A excreção urinária da NAG (uNAG) demonstrou estar elevada em diabéticos quando comparados com controlos não-diabéticos.[128, 129] Este marcador também se correlacionou positivamente com a duração da doença e com mau controlo glicémico reforçando a relação deste marcador com a hiperglicemia e o risco das complicações da ND. [83, 130]

Em diabéticos o uNAG demonstrou um aumento nos microalbuminúricos face a controlos saudáveis e normoalbuminúricos. [83, 131] Com base numa análise de curva ROC, que comparou este marcador com a NGAL e Cistatina C, a uNAG demonstrou ser o marcador mais sensível, deste conjunto, para a microalbuminúria com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 77,8%.[83] Este valor preditivo é também suportado pela constatação de que normoalbuminúricos, com TFG e albuminúria normais, demonstraram um aumento 9 vezes na uNAG face ao observado em controlos. [85] A relação é também sustentada pela associação significativa da regressão da albuminúria com valores basais baixos e aumento progressivo da uNAG, num estudo longitudinal. [98]

Este marcador exibe valor preditivo para a microalbuminúria e para regressão desta e por isto adiciona um benefício ao diferenciar doentes com maior risco de progressão numa fase precoce da doença. Este marcador para ser analisado requer o emprego ou de uma técnica colorimétrica ou ELISA, sendo que este último não depende da atividade hidrolítica desta enzima para determinação quantitativa.

Proteómica

A proteómica representa o estudo, na função ou estrutura, em larga escala de proteínas. Esta análise permite, de modo simultâneo, identificar, quantificar e analisar, várias moléculas com potencial preditivo. Atendendo ao descrito até agora neste texto, torna-se evidente a multiplicidade de moléculas envolvidas na patogénese na ND e que podem servir como marcadores. Para esta pesquisa, a proteómica tem ganho atenção recentemente com a obtenção de perfis com significado preditivo bem como na identificação de proteínas que possam servir de marcadores convencionais. [132]

Um exemplo desta aplicação foi um estudo no qual foram reconhecidos conjuntos específicos de 54 polipéptidos presentes apenas na DM1 e outro conjunto de 88 polipéptidos presente apenas doentes com nefropatia incipiente. [133] Outro estudo em diabéticos procurou marcadores urinários para DM, ND e doenças renais não diabéticas com proteinúria. Entre diabéticos, 102 marcadores urinários diferiram significativamente entre doentes normoalbuminúricos e aqueles com ND, tendo sido obtido um modelo com 65 destes marcadores que identificou corretamente ND com especificidade e sensibilidade de 97%. [134]

Num estudo subsequente, mas baseado no anterior, foi testada a validade diagnóstica deste modelo com recurso a uma análise informática ao conjunto dos 65 polipéptidos. Este modelo exibiu 93,8% e 91,4% de sensibilidade e especificidade, respetivamente. e uma AUC, em análise de curva ROC, de 0,948 um resultado significativamente superior a qualquer valor homologado de outro marcador já referido. [135]

Um modelo classificador desenhado para a DRC, foi aplicado em doentes diabéticos num estudo coorte de 5 anos, tendo obtido uma AUC de 0.93 para a deteção precoce da progressão para macroalbuminúria. [136]

Com base num outro classificador proteómico, uma investigação do tipo caso-controlo com base em casos dos estudos *PREVEND* e *Steno*, foi possível constatar uma associação independente entre um discriminador proteómico e as progressões para microalbuminúria e macroalbuminúria. [137]

São vários os estudos, que desde a caracterização à validação destes perfis, criam a esperança de no futuro existirem ferramentas não invasivas de elevado valor preditivo para fins prognósticos e diagnósticos, com base na análise proteómica. [138]

miRNA

Os miRNA (microRNAs) são pequenas moléculas não codificantes de RNA que exercem funções na regulação pós-transcricional da expressão génica.[139] Por estarem diretamente relacionados com a transcrição molecular os miRNAs tem o potencial serem marcadores mais precoces que a expressão de várias moléculas convencionais. De modo semelhante à proteómica, a genómica de miRNAs permite identificar e quantificar simultaneamente um conjunto de diferentes miRNAs, permitindo estabelecer relações patofisiológicas e perfis com valor preditivo

Como exemplo prático do potencial desta técnica na ND, um estudo permitiu concluir que nestes doentes e com lesões glomeruloescleróticas ocorria uma expressão urinária diminuída de miR-15 face a outros grupos de doentes. Neste estudo dois miRNAs, o miR-21 e o miR-216a correlacionaram-se com a taxa de declínio da função renal e o risco de progressão para diálise. [140]

Num estudo longitudinal com 20 anos de seguimento em doentes com DM1, um total de 27 miRNAs tiveram os níveis significativamente alterados em diferentes estádios da ND. Estes miRNAs estão implicados em vias relativas à sinalização de fatores de crescimento e de fibrose renal.[141]

Presentemente esta análise pode ser feita, de modo adequado e reproduzível, tanto com recurso a amostras séricas como urinárias. As amostras urinárias representam uma vantagem dado não serem invasivas, mas os procedimentos necessários para o processamento destas amostras tornam pouco praticável o seu uso mesmo em contexto laboratorial. [142]

Algumas destas moléculas tem relações estabelecidas com alterações patológicas, como por exemplo o miRNA-21 cuja expressão induz o fator de transformação do crescimento beta (TGFb), um poderoso agente pró-esclerótico com um papel central na patofisiologia da ND. Este subtipo de RNA poderão também servir de alvo terapêutico na ND. Exemplo disto é a observação de melhoria na microalbuminúria, fibrose e inflamação num modelo animal de DM após uma intervenção que desativava a expressão do miRNA-21.[142]

Em resumo a genómica de miRNA tem elevado potencial na identificação dos miRNA, e das suas proteínas associadas, e na caracterização de eventual valor preditivo. No entanto os custos e procedimentos laboriosos e complexos associados a esta análise o seu uso rotineiro impraticável mesmo a média prazo.

Conclusão

Como foi sendo referido ao longo do presente trabalho, os custos e a carga epidemiológica da ND são significativos e é esperado que no futuro continuem a aumentar, em particular nos países em vias de desenvolvimento. Assim sendo, para estes países, mas também para os países desenvolvidos, a prevenção a nível primário e secundário apresenta-se como sendo a mais pertinente, dado ser o método mais económico e com maiores benefícios a longo prazo.

As intervenções precoces para a ND presentemente possíveis referem-se ao tratamento da DM, da TA e de outros fatores de risco. Já o tratamento com inibidores do SRAA não é específico para a ND e apresenta limitações em termos de evidência e de indicações. Contudo, estas intervenções poderão ser as responsáveis pela diminuição dos riscos de proteinúria, de DRCT e de morte por DRCT. Podemos, deste modo, presumir que estas intervenções seriam ainda mais úteis se aplicadas mais precocemente, de preferência nos estádios pré-albuminúricos da ND, caso um marcador evidencie fiável para tais estádios.

A albuminúria, enquanto marcador da ND, apresenta muitas limitações que ficaram evidentes na análise epidemiológica: revelou-se menos específica e sensível do que pensado anteriormente, particularmente nos estádios mais precoces da doença.

Na procura de novos marcadores emergiram várias moléculas com diversos papéis na patofisiologia da ND. A utilidade de muitas delas como marcadores é limitada a um ou dois estádios da doença, consequência do papel que têm nos eventos patofisiológicos predominantes de cada estágio.

De modo sumário e perante a evidência disponível, nenhum marcador descrito no presente trabalho, quando comparado com a albuminúria, demonstrou ter melhor valor preditivo na progressão da ND e muitos deles foram descobertos em estudos transversais com um número de participantes relativamente baixo. No entanto, a maioria deles merece destaque pois

demonstraram capacidade preditiva para o declínio da TFG e para a albuminúria, em alguns casos de modo independente destes parâmetros.

Não obstante, numa parte significativa dos casos seriam necessários estudos longitudinais com um número elevado de participantes para se poder concluir, com um elevado grau de certeza, associações e valor preditivo para parâmetros como a TFG ou eventos renais como a DRCT.

Existem duas categorias especiais de marcadores para a ND: os miRNA e a proteómica. Ambos representam técnicas inovadoras e complexas que permitem análises simultâneas a diversas moléculas de um modo mais direto. Contudo, as técnicas laboratoriais empregues para estas classes de marcadores são dispendiosas e morosas e o processamento é complexo, o que dificulta, para já, o seu uso clínico.

Em suma, a aplicação dos miRNAs e da proteómica na ND mostrou sensibilidade e especificidades elevadas, superiores aos marcadores ditos convencionais. Todavia, o seu elevado custo impede, atualmente, a sua aplicação generalizada, em especial em países em vias de desenvolvimento.

Referências

1. Forouhi, N.G. and N.J. Wareham, *Epidemiology of diabetes*. Medicine, 2014. **42**(12): p. 698-702.
2. Whiting, D.R., et al., *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes research and clinical practice, 2011. **94**(3): p. 311-321.
3. Nichols, G.A., S. Vupputuri, and H. Lau, *Medical care costs associated with progression of diabetic nephropathy*. Diabetes care, 2011. **34**(11): p. 2374-2378.
4. Trivedi, H.S., et al., *Slowing the progression of chronic renal failure: economic benefits and patients' perspectives*. American Journal of Kidney Diseases, 2002. **39**(4): p. 721-13.
5. Economics, D.A., *Two of a KinD (Kidneys in Diabetes): the burden of diabetic kidney disease and the cost effectiveness of screening people with type 2 diabetes for chronic kidney disease*. Kidney Health Australia. Melbourne, VIC: Kidney Health Australia, 2011.
6. Association, A.D., 9. *Microvascular complications and foot care*. Diabetes Care, 2016. **39**(Supplement 1): p. S72-S80.
7. Foundation, N.K., *KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update*. American Journal of Kidney Diseases, 2012. **60**(5): p. 850-886.
8. Levin, A. and M. Rocco, *KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease*. American Journal of Kidney Diseases, 2007. **49**(2): p. S10-S179.
9. Strimbu, K. and J.A. Tavel, *What are biomarkers?* Current Opinion in HIV and AIDS, 2010. **5**(6): p. 463.
10. Edelstein, C.L., *Biomarkers of kidney disease*. 2010: Academic Press.
11. Chen, S., C. Khoury, and F.N. Ziyadeh, *Chapter 78 - Pathophysiology and Pathogenesis of Diabetic Nephropathy A2 - Alpern, Robert J*, in *Seldin and Giebisch's The Kidney (Fifth Edition)*, O.W. Moe and M. Caplan, Editors. 2013, Academic Press. p. 2605-2632.
12. Avancini Caramori, M.L. and P. Rossing, *Chapter 54 - Diabetic Nephropathy A2 - Jameson, J. Larry*, in *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*, L.J.D. Groot, et al., Editors. 2016, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 934-957.e12.

13. Seshan, S.V. and A.S. Reddi, *Albuminuria–Proteinuria in Diabetes Mellitus*, in *Diabetes and Kidney Disease*, V.E. Lerma and V. Batuman, Editors. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 107-117.
14. Packham, D.K., et al., *Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database*. Am J Kidney Dis, 2012. **59**(1): p. 75-83.
15. Astrup, A.S., et al., *Improved prognosis in type 1 diabetic patients with nephropathy: a prospective follow-up study*. Kidney Int, 2005. **68**(3): p. 1250-7.
16. Grossman, E. and F. Messerli, *Hypertension and diabetes*, in *Cardiovascular diabetology: Clinical, metabolic and inflammatory facets*. 2008, Karger Publishers. p. 82-106.
17. Adler, A.I., et al., *Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study*. BMJ, 2000. **321**(7258): p. 412-419.
18. Berl, T., et al., *Impact of achieved blood pressure on cardiovascular outcomes in the Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(7): p. 2170-9.
19. Pohl, M.A., et al., *Independent and additive impact of blood pressure control and angiotensin II receptor blockade on renal outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial: clinical implications and limitations*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 3027-37.
20. Bakris, G.L., et al., *Effects of blood pressure level on progression of diabetic nephropathy: results from the RENAAL study*. Arch Intern Med, 2003. **163**(13): p. 1555-65.
21. Barnett, A.H., et al., *Angiotensin-Receptor Blockade versus Converting–Enzyme Inhibition in Type 2 Diabetes and Nephropathy*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(19): p. 1952-1961.
22. Hebert, L.A., et al., *Remission of nephrotic range proteinuria in type I diabetes. Collaborative Study Group*. Kidney Int, 1994. **46**(6): p. 1688-93.
23. Atkins, R.C., et al., *Proteinuria reduction and progression to renal failure in patients with type 2 diabetes mellitus and overt nephropathy*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(2): p. 281-7.
24. de Zeeuw, D., et al., *Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2309-20.
25. Narita, T., et al., *Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients*. Diabetes care, 2004. **27**(5): p. 1176-1181.
26. Kanwar, Y.S., et al., *Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression*. Experimental biology and medicine, 2008. **233**(1): p. 4-11.
27. Matheson, A., et al., *Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2010. **26**(3): p. 150-171.
28. Lehmann, R. and E.D. Schleicher, *Molecular mechanism of diabetic nephropathy*. Clinica Chimica Acta, 2000. **297**(1): p. 135-144.
29. Torffvit, O. and B. Rippe, *Size and charge selectivity of the glomerular filter in patients with insulin-dependent diabetes mellitus: urinary immunoglobulins and glycosaminoglycans*. Nephron, 1999. **83**(4): p. 301-307.
30. Jeansson, M., et al., *Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice*. Diabetologia, 2006. **49**(9): p. 2200-2209.
31. Andersen, S., et al., *Glomerular permselectivity in early stages of overt diabetic nephropathy*. Kidney international, 2000. **58**(5): p. 2129-2137.

32. Rippe, C., et al., *Size and charge selectivity of the glomerular filter in early experimental diabetes in rats*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007. **293**(5): p. F1533-F1538.
33. Anderson, S. and B.M. Brenner, *Pathogenesis of diabetic glomerulopathy: hemodynamic considerations*. Diabetes/metabolism reviews, 1988. **4**(2): p. 163-177.
34. Birn, H. and E. Christensen, *Renal albumin absorption in physiology and pathology*. Kidney international, 2006. **69**(3): p. 440-449.
35. Haraldsson, B., J. Nyström, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. Physiological reviews, 2008. **88**(2): p. 451-487.
36. Venturoli, D. and B. Rippe, *Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **288**(4): p. F605-F613.
37. De Zeeuw, D., et al., *Renal risk and renoprotection among ethnic groups with type 2 diabetic nephropathy: a post hoc analysis of RENAAL*. Kidney international, 2006. **69**(9): p. 1675-1682.
38. Dinneen, S.F. and H.C. Gerstein, *The association of microalbuminuria and mortality in non—insulin-dependent diabetes mellitus: a systematic overview of the literature*. Archives of internal medicine, 1997. **157**(13): p. 1413-1418.
39. Ninomiya, T., et al., *Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes*. Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **20**(8): p. 1813-1821.
40. Wachtell, K., et al., *Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study*. Annals of internal medicine, 2003. **139**(11): p. 901-906.
41. Klausen, K., et al., *Very low levels of microalbuminuria are associated with increased risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes*. Circulation, 2004. **110**(1): p. 32-35.
42. An, J.H., et al., *The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean type 2 diabetic patients: a possible early stage renal complication*. Journal of Korean medical science, 2009. **24**(Suppl 1): p. S75-S81.
43. Kazumi, T., et al., *Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 1999. **22**(7): p. 1176-1180.
44. KANAUCHI, M., et al., *Diagnostic significance of urinary transferrin in diabetic nephropathy*. 日本腎臓学会誌, 1995. **37**(11): p. 649-654.
45. Kanauchi, M., Y. Akai, and T. Hashimoto, *Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury*. European Journal of Internal Medicine, 2002. **13**(3): p. 190-193.
46. Narita, T., et al., *Low dose of losartan decreased urinary excretions of IgG, transferrin, and ceruloplasmin without reducing albuminuria in normoalbuminuric type 2 diabetic patients*. Hormone and metabolic research, 2008. **40**(04): p. 292-295.
47. Yonglie, Z., Z. Xuejun, and W. Jianguo, *CLINICAL SIGNIFICANCE OF MICROTRANSFERRINURIA IN DIABETIC PATIENTS*. CHINESE JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, 1997: p. 03.
48. O'Donnell, M., et al., *Urinary Transferrin Excretion in Type 1 (Insulin-dependent) Diabetes Mellitus*. Diabetic medicine, 1991. **8**(7): p. 657-661.
49. O'Donnell, M., et al., *Increased urinary transferrin excretion in exercising normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients*. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine, 1991. **28**(5): p. 456-460.
50. McCormick, C., J. Konen, and Z. Shihabi, *Microtransferrinuria and microalbuminuria. I. In the diabetic human*. Clinical physiology and biochemistry, 1989. **8**(2): p. 53-58.

51. Narita, T., et al., *Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes*. Diabetes care, 2006. **29**(1): p. 142-144.
52. Cheung, C., et al., *Urinary excretion of transferrin by non-insulin-dependent diabetics: a marker for early complications?* Clinical chemistry, 1989. **35**(8): p. 1672-1674.
53. O'Donnell, M., et al., *Transferrinuria in type 2 diabetes: the effect of glycaemic control*. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine, 1991. **28**(2): p. 174-178.
54. Ortiz, A. and J. Egido, *Is there a role for specific anti-TNF strategies in glomerular diseases?* Nephrology Dialysis Transplantation, 1995. **10**(3): p. 309-311.
55. Zhang, B., et al., *Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells*. Kidney international, 2007. **72**(1): p. 37-44.
56. Khan, S.B., et al., *Antibody blockade of TNF- α reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis*. Kidney international, 2005. **67**(5): p. 1812-1820.
57. Navarro, J.F. and C. Mora-Fernández, *The role of TNF- α in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications*. Cytokine & growth factor reviews, 2006. **17**(6): p. 441-450.
58. Misseri, R., et al., *TNF- α mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **288**(2): p. F406-F411.
59. Navarro, J.F., et al., *Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behaviour of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in type 2 diabetic patients*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2008. **23**(3): p. 919-926.
60. Wu, C.-C., et al., *Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy*. Clinica Chimica Acta, 2010. **411**(9): p. 700-704.
61. Navarro, J.F., et al., *Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus*. American Journal of Kidney Diseases, 2003. **42**(1): p. 53-61.
62. Navarro, J.F., et al., *Urinary tumour necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006. **21**(12): p. 3428-3434.
63. Niewczas, M.A., et al., *Serum concentrations of markers of TNF α and Fas-mediated pathways and renal function in nonproteinuric patients with type 1 diabetes*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2009. **4**(1): p. 62-70.
64. Niewczas, M.A., et al., *Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes*. Journal of the American Society of Nephrology, 2012. **23**(3): p. 507-515.
65. Forsblom, C., et al., *Added Value of Soluble Tumor Necrosis Factor- α Receptor 1 as a Biomarker of ESRD Risk in Patients With Type 1 Diabetes*. Diabetes Care, 2014. **37**(8): p. 2334-2342.
66. Bader, R., et al., *Structure and Function of the Kidney in Diabetic Glomerulosclerosis*. Pathology - Research and Practice, 1980. **167**(2): p. 204-216.
67. Thomas, M.C., W.C. Burns, and M.E. Cooper, *Tubular changes in early diabetic nephropathy*. Advances in Chronic Kidney Disease. **12**(2): p. 177-186.
68. Bonventre, J.V., *Can We Target Tubular Damage to Prevent Renal Function Decline in Diabetes?* Seminars in nephrology, 2012. **32**(5): p. 452-462.
69. Tang, S.C.W. and K.N. Lai, *The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2012. **27**(8): p. 3049-3056.
70. Schmidt-Ott, K.M., et al., *Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*. Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **18**(2): p. 407-413.

71. Nickolas, T.L., et al., *Monomeric neutrophil gelatinase associated lipocalin is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease*. *Kidney international*, 2012. **82**(6): p. 718-722.
72. Fu, W.-j., et al., *Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study*. *Endocrine*, 2012. **41**(1): p. 82-88.
73. Demir, K., et al., *Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normoalbuminuric normotensive type 1 diabetic adolescents*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2012. **25**(5-6): p. 517-23.
74. Assal, H.S., et al., *Serum Cystatin C and Tubular Urinary Enzymes as Biomarkers of Renal Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus*. *Clinical Medicine Insights. Endocrinology and Diabetes*, 2013. **6**: p. 7-13.
75. Ucakurk, A., et al., *Kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase associated lipocalin in normoalbuminuric diabetic children*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016. **29**(2): p. 145-51.
76. de Carvalho, J.A., et al., *Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes*. *Clin Biochem*, 2016. **49**(3): p. 232-6.
77. Hafez, M.H., et al., *Detection of an earlier tubulopathy in diabetic nephropathy among children with normoalbuminuria*. *Iran J Kidney Dis*, 2015. **9**(2): p. 126-31.
78. Nielsen, S.E., et al., *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril*. *Diabetic Medicine*, 2010. **27**(10): p. 1144-1150.
79. Lacquaniti, A., et al., *"Normoalbuminuric" diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL*. *Acta Diabetologica*, 2013. **50**(6): p. 935-942.
80. de Carvalho, J.A.M., et al., *Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes*. *Clinical Biochemistry*, 2016. **49**(3): p. 232-236.
81. Fu, W.J., et al., *Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study*. *Endocrine*, 2012. **41**(1): p. 82-8.
82. Garg, V., et al., *Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy*. *Clin Exp Nephrol*, 2015. **19**(5): p. 895-900.
83. Assal, H.S., et al., *Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. *Clinical medicine insights. Endocrinology and diabetes*, 2013. **6**: p. 7.
84. Nielsen, S.E., et al., *Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients*. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2012. **97**(1): p. 71-76.
85. Nauta, F.L., et al., *Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(4): p. 975-981.
86. Nielsen, S.E., et al., *Tubular markers do not predict the decline in glomerular filtration rate in type 1 diabetic patients with overt nephropathy*. *Kidney Int*, 2011. **79**(10): p. 1113-8.
87. Wu, J., et al., *Urinary TNF-alpha and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes*. *Exp Ther Med*, 2013. **6**(6): p. 1482-1488.
88. Fufaa, G.D., et al., *Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2015. **58**(1): p. 188-98.
89. Lim, A.I., et al., *Kidney injury molecule-1: More than just an injury marker of tubular epithelial cells?* *Journal of Cellular Physiology*, 2013. **228**(5): p. 917-924.
90. Shao, X., et al., *Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e84131.

91. El-Ashmawy, N.E., et al., *Kidney injury molecule-1 (Kim-1): an early biomarker for nephropathy in type II diabetic patients*. International Journal of Diabetes in Developing Countries, 2015. **35**(3): p. 431-438.
92. Kim, S.S., et al., *Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **97**(2): p. 251-7.
93. Kin Tekce, B., et al., *Evaluation of the Urinary Kidney Injury Molecule-1 Levels in Patients With Diabetic Nephropathy*. 2014, 2014: p. 7.
94. Nielsen, S.E., et al., *Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **97**(1): p. 71-6.
95. Conway, B.R., et al., *Measuring urinary tubular biomarkers in type 2 diabetes does not add prognostic value beyond established risk factors*. Kidney Int, 2012. **82**(7): p. 812-8.
96. Tekce, B.K., et al., *Evaluation of the Urinary Kidney Injury Molecule-1 Levels in Patients With Diabetic Nephropathy*. Clinical & Investigative Medicine, 2014. **37**(6): p. 377-383.
97. Abd El Dayem, S., M. El Bohy Ael, and A. El Shehaby, *Value of the intrarenal arterial resistivity indices and different renal biomarkers for early identification of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2016. **29**(3): p. 273-9.
98. Vaidya, V.S., et al., *Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl-β-D-glucosaminidase*. Kidney international, 2011. **79**(4): p. 464-470.
99. Nielsen, S.E., et al., *The effect of RAAS blockade on markers of renal tubular damage in diabetic nephropathy: u-NGAL, u-KIM1 and u-LFABP*. Scand J Clin Lab Invest, 2012. **72**(2): p. 137-42.
100. Kamijo, A., et al., *Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006. **284**(1): p. 175-182.
101. Kamijo-Ikemori, A., et al., *Urinary liver type fatty acid binding protein in diabetic nephropathy*. Clinica Chimica Acta, 2013. **424**: p. 104-108.
102. Kamijo, A., et al., *Urinary liver-type fatty acid binding protein as a useful biomarker in chronic kidney disease*. Mol Cell Biochem, 2006. **284**(1-2): p. 175-82.
103. Nielsen, S.E., et al., *Tubular and Glomerular Injury in Diabetes and the Impact of ACE Inhibition*. Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1684-1688.
104. Kamijo-Ikemori, A., et al., *Clinical Significance of Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein in Diabetic Nephropathy of Type 2 Diabetic Patients*. Diabetes Care, 2011. **34**(3): p. 691-696.
105. Panduru, N.M., et al., *Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein and Progression of Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetes*. Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. 2077-2083.
106. Viswanathan, V., et al., *Clinical significance of urinary liver-type fatty acid binding protein at various stages of nephropathy*. Indian Journal of Nephrology, 2015. **25**(5): p. 269-273.
107. Araki, S., et al., *Predictive effects of urinary liver-type fatty acid-binding protein for deteriorating renal function and incidence of cardiovascular disease in type 2 diabetic patients without advanced nephropathy*. Diabetes Care, 2013. **36**(5): p. 1248-53.
108. Viswanathan, V., et al., *Clinical significance of urinary liver-type fatty acid binding protein at various stages of nephropathy*. Indian journal of nephrology, 2015. **25**(5): p. 269.
109. Nielsen, S.E., et al., *Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. 1320-4.
110. Nielsen, S.E., et al., *Urinary Liver-Type Fatty Acid-Binding Protein Predicts Progression to Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. 1320-1324.
111. Frey, S.K., et al., *Isoforms of retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver*. Lipids Health Dis, 2008. **7**: p. 29.

112. Salem, M.A., et al., *Urinary excretion of n-acetyl-beta-D-glucosaminidase and retinol binding protein as alternative indicators of nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus*. *Pediatr Diabetes*, 2002. **3**(1): p. 37-41.
113. Hong, C.Y., K.S. Chia, and S.L. Ling, *Urine protein excretion among Chinese patients with type 2 diabetes mellitus*. *Med J Malaysia*, 2000. **55**(2): p. 220-9.
114. Park, S.E., et al., *Association of urinary RBP4 with insulin resistance, inflammation, and microalbuminuria*. *Eur J Endocrinol*, 2014. **171**(4): p. 443-9.
115. *Measures of Tubular Function in Normoalbuminuric Insulin-Dependent Diabetic Patients and Their Relationship with Sodium Lithium Countertransport Activity*. *Nephron*, 1996. **73**(4): p. 613-618.
116. Titan, S.M., et al., *Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy*. *J Diabetes Complications*, 2012. **26**(6): p. 546-53.
117. Penders, J. and J.R. Delanghe, *Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications*. *Clin Chim Acta*, 2004. **346**(2): p. 107-18.
118. Saif, A. and N. Soliman, *Urinary alpha 1-microglobulin and albumin excretion in children and adolescents with type 1 diabetes*. *J Diabetes*, 2016.
119. Petrica, L., et al., *Glycated peptides are associated with proximal tubule dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(2): p. 2516-25.
120. Hong, C.-Y., et al., *Urinary α 1-Microglobulin as a Marker of Nephropathy in Type 2 Diabetic Asian Subjects in Singapore*. *Diabetes Care*, 2003. **26**(2): p. 338-342.
121. Petrica, L., et al., *Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e112538.
122. Robles-Osorio, M.L. and E. Sabath, *Tubular dysfunction and non-albuminuric renal disease in subjects with type 2 diabetes mellitus*. *Rev Invest Clin*, 2014. **66**(3): p. 234-9.
123. Petrica, L., et al., *Nephro- and neuroprotective effects of rosiglitazone versus glimepiride in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial*. *Wien Klin Wochenschr*, 2009. **121**(23-24): p. 765-75.
124. Petrica, L., et al., *Proximal tubule dysfunction is dissociated from endothelial dysfunction in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study*. *Nephron Clin Pract*, 2011. **118**(2): p. c155-64.
125. G. Nikolov, M.B., T. Gruev, S. Biljali, O. Stojceva- and a.E.M.-S. Taneva, *Urinary biomarkers in the early diagnosis of renal damage in diabetes mellitus patients*. *Scripta Scientifica Medica*, 2013. **vol. 45**(no. 3): p. pp. 58–64.
126. Brott, D.A., et al., *Characterization of renal biomarkers for use in clinical trials: effect of preanalytical processing and qualification using samples from subjects with diabetes*. *Drug Des Devel Ther*, 2015. **9**: p. 3191-8.
127. Vincent J-L, H.J., Vincent J.L., *Encyclopedia of intensive care medicine*. 2012.
128. Sheira, G., et al., *Urinary biomarker N-acetyl-beta-D-glucosaminidase can predict severity of renal damage in diabetic nephropathy*. *J Diabetes Metab Disord*, 2015. **14**: p. 4.
129. Bouvet, B.R., et al., *Evaluation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as a marker of early renal damage in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014. **58**(8): p. 798-801.
130. Mohammadi-Karakani, A., et al., *Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients*. *J Clin Lab Anal*, 2007. **21**(6): p. 413-7.
131. Vaidya, V.S., et al., *Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase*. *Kidney Int*, 2011. **79**(4): p. 464-70.
132. Blackstock, W.P. and M.P. Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. *Trends in biotechnology*, 1999. **17**(3): p. 121-127.

133. Meier, M., et al., *Identification of urinary protein pattern in type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis*. Journal of diabetes and its complications, 2005. **19**(4): p. 223-232.
134. Rossing, K., et al., *Urinary proteomics in diabetes and CKD*. Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **19**(7): p. 1283-1290.
135. Alkhalaf, A., et al., *Multicentric validation of proteomic biomarkers in urine specific for diabetic nephropathy*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13421.
136. Zürlbig, P., et al., *Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3304-3313.
137. Roscioni, S., et al., *A urinary peptide biomarker set predicts worsening of albuminuria in type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2013. **56**(2): p. 259-267.
138. Ameer, R.B., et al., *Proteomic approaches for discovering biomarkers of diabetic nephropathy*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2010. **25**(9): p. 2866-2875.
139. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. cell, 2004. **116**(2): p. 281-297.
140. Szeto, C.-C., et al., *Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases*. Disease markers, 2012. **33**(3): p. 137-144.
141. Argyropoulos, C., et al., *Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54662.
142. Simpson, K., et al., *MicroRNAs in Diabetic Nephropathy: From Biomarkers to Therapy*. Current diabetes reports, 2016. **16**(3): p. 1-7.